

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002209

International filing date: 03 March 2005 (03.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 011 822.1
Filing date: 11 March 2004 (11.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 06 April 2005 (06.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2004 011 822.1

Anmeldetag: 11. März 2004

Anmelder/Inhaber: Cognis Deutschland GmbH & Co KG,
40589 Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Qualitätssicherungssystem zum Nachweis
von Mikroorganismen

IPC: C 12 Q 1/02

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 16. Dezember 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Faust

Qualitätssicherungssystem zum Nachweis von Mikroorganismen

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung befindet auf dem Gebiet des Nachweises von Mikroorganismen und der Qualitätsüberprüfung von filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Produkten sowie zur Beurteilung des Hygienezustandes von Produktionsanlagen.

Stand der Technik

Die Identifizierung von Mikroorganismen in Produkten konnte lange Zeit nur durch zeitaufwendige Kultivierung und einhergehender Amplifizierung erfolgen, wobei die geforderten Ergebnisse erst nach 1 bis 2 Wochen vorlagen. Die Kultivierung erfolgte beispielsweise für Bakterien, Pilze und einzellige Algen in den jeweils günstigsten Nährmedien.

Bei dieser Kontrolle wird überprüft, wie viele und welche Mikroorganismen pro Volumeneinheit im Endprodukt vorhanden sind. Hierbei sind vor allem die vermehrungsfähigen lebenden Mikroorganismen von Interesse, die eine unerwünschte Kontamination des Zwischen- oder Endproduktes hervorrufen können.

Eine klassische Methode ist beispielsweise die Membranfiltration, bei der die Proben kultiviert und filtriert werden und die Mikroorganismen auf der Membran verbleiben. Auf dieser Membran werden die Mikroorganismen vermehrt und identifiziert. Weitere Verfahren sind die Standprobe und teilweise auch die PCR (polymerase chain reaction). Da die PCR jedoch auch bei „nackter“ DNA positiv ausfällt, kommt es hier häufig zu falsch positiv Ergebnissen.

All diese Verfahren haben jedoch den Nachteil, dass die Behandlung der Proben sehr aufwendig ist und erst frühestens nach mehreren Tagen bis Wochen das Ergebnis bekannt ist.

Weiterentwicklungen der bekannten Verfahren haben z.B. zu Methoden geführt, die es ermöglichen, in filtrierbaren Produkten wie Getränken über die sogenannten „Direct Epifluorescent Filter Technique (DEFT)“ lebende Zellen direkt zu identifizieren, indem Fluoreszenzfarbstoffe, welche an DNA binden und so die Synthese der RNA blockieren, in die Zellen gebracht werden und die Zellen durch Epifluoreszenzmikroskopie detektiert werden (Kroll, R.; Me-

thods in Molecular Biology; 1995; 46; S 113-121). In der EP 386051 oder in DE 19841588 wird beispielsweise beschrieben, wie die DEFT-Methode durch Verwendung von Induktoren zur Bildung bestimmter Enzyme in lebenden Mikroorganismen und anschließende Gabe eines Fluoreszenzreagenz, welches durch Reaktion mit dem gebildeten Enzym fluoresziert und dann detektiert werden kann, abgewandelt werden kann. Diese Methode wird jedoch nur für den Nachweis von coliformen Bakterien oder von Laktobazillen beschrieben. Des weiteren kann die DEFT-Methode in allen bekannten Abwandlungen nur für filtrierbare Produkte angewendet werden, was einen großen Nachteil darstellt. Bei dieser Methode ergibt sich zusätzlich das Problem der Nachweisgrenze. Es müssen mindestens zwischen 10 und 1000 Keime pro Fläche, die ausgezählt wird, vorhanden sein. Diese hohe Zahl an Mikroorganismen in einer Probe entspricht jedoch nicht den heutigen Hygieneanforderungen, so dass Systeme notwendig werden, die eine geringere Anzahl von Mikroorganismen in einer Probe schnell und ohne viel Aufwand detektierbar machen.

Für nichtfiltrierbare Produkte findet sich im Stand der Technik eine Methode, die durch *in-situ* Hybridisierung mit fluoreszierenden Nucleinsäuresonden zum Nachweis von spezifischen Mikroorganismen führt. Dieses als „FISH – Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung“ bezeichnete Verfahren dient zum Nachweis und zur Lokalisierung jeder Art von Nucleinsäuren in Zellen. Dabei wird mit Hilfe einer markierten RNA- oder DNA-Sonde eine molekulare Hybridisierung mit der in den Chromosomen befindlichen DNA/RNA durchgeführt. (FISH; Amann, R.L, W. Ludwig und K.-H. Schleifer, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbial. Rev. 59, S. 143–169; siehe auch DE 10160666). Die spezifische Hybridisierung der Sonde wird durch fluoreszenzmikroskopische Techniken nachgewiesen wie beispielsweise in DE 19936875 beschrieben.

Die FISH-Technik basiert auf der Tatsache, dass es in Bakterienzellen bestimmte Moleküle gibt, die aufgrund ihrer lebenswichtigen Funktion im Laufe der Evolution nur wenig mutiert wurden: Die 16S und die 23S ribosomale Ribonukleinsäure (rRNS). Beide sind Bestandteile der Ribosomen, den Orten der Proteinbiosynthese, und können aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung, ihrer Größe, und ihrer strukturellen und funktionellen Konstanz als spezifische Marker dienen. Die rRNA Datenbanken können dazu verwendet werden, art- und gattungsspezifische Gensonden zu konstruieren. Hierbei werden alle verfügbaren rRNA Sequenzen miteinander verglichen und für bestimmte Sequenzstellen Sonden entworfen, die spezifisch eine Bakterienart, -gattung oder -gruppe erfassen.

Bei der FISH -Technik werden diese Gensonden, die zu einer bestimmten Region auf der ribosomalen Zielsequenz komplementär sind, in die Zelle geschleust. Die Gensonden sind in der Regel kleine, 16–20 Basen lange, einzelsträngige Desoxyribonukleinsäurestücke und rich-

ten sich gegen eine Zielregion, welche typisch für eine Bakterienart oder eine Bakteriengruppe ist. Findet die fluoreszenzmarkierte Sonde in einer Bakterienzelle ihre Zielsequenz, so bindet sie daran und die Zellen können aufgrund ihrer Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Untersuchungen belegen jedoch, dass durch große Populationsschwankungen statistische Probleme bei der Probenahme bei diesen Methoden auftreten. Auch hier ergibt sich die Schwierigkeit der Nachweisgrenze, denn auch hier sind mindestens zwischen 10 und 1000 Keime pro Fläche, die ausgezählt wird, notwendig um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Diese hohe Zahl an Mikroorganismen in einer Probe entspricht nicht den heutigen Hygienestandards.

Obwohl laut internationalem Arzneimittelgesetzbuch (Ph. Eur.) eine Nachweisgrenze von < 100 CFU/g noch akzeptabel und hinreichend ist für den Vertrieb von Produkten, erwartet die Industrie und der Verbraucher heute eine weit geringere Nachweisgrenze bzw. sind die Hygieneanforderungen an Produkte heute so hoch, dass eine Nachweisgrenze < 10 CFU/g unausweichlich ist und eine Nachweisgrenze < 1 CFU/g angestrebt werden sollte.

Die Methoden zum Nachweis und zur Quantifizierung von Mikroorganismen müssen immer sensibler und bedienungsfreundlicher werden, um den Anforderungen an schnellen Nachweismethoden mit hoher Effizienz, niedrigen Nachweisgrenzen und geringem Aufwand für möglichst viele unterschiedliche Mikroorganismen gerecht zu werden. Dabei ist es oftmals ausreichend, wenn zunächst nur ein „Abwesenheitstest“ durchgeführt wird (Ja/Nein-Test) und getestet wird, ob überhaupt Mikroorganismen in der Probe enthalten sind, bevor diese taxonomisch bestimmt werden. Es ist zu zeitaufwendig und fordert zuviel Laborkapazität, wenn für die unterschiedlichsten Mikroorganismen viele Nachweismethoden angewendet werden müssen oder aus dem Angebot der unterschiedlichsten Methoden auf dem Markt die jeweils effektivste gewählt werden muss.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein System zur Verfügung zu stellen, mit dem sowohl filtrierbare als auch nicht filtrierbare Proben und Produkte untersucht werden und durch ein schnelles Verfahren der quantitative Nachweis verschiedenster Mikroorganismen sowohl lebend als auch tot möglich wird. Das System sollte es ermöglichen, Mikroorganismen mit einer Nachweisgrenze von < 10 CFU/g in der gewählten Probenmenge nachzuweisen. Das System sollte nicht nur speziell für einen Organismus anwendbar sein, sondern einen generellen Nachweis für Mikroorganismen in Proben und Produkten zur Verfügung stellen. Mit dem System sollte es auch möglich sein, den Hygienestatus von Produktionsanlagen zu überprüfen.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Qualitätssicherungssystem zum Nachweis von vermehrungsfähigen Mikroorganismen enthaltend,

- a) ein System zur Anreicherung von Mikroorganismen in einer Probe in einer "Übernachtskultur" entsprechend 8 bis 24 Stunden Kultivierung unter Standardbedingungen gemäß internationalen Arzneimittelgesetzbüchern, Lebensmittelgesetzgebungen und Kosmetikverordnungen (beispielsweise Ph.Eur.),
- b) ein Kit (aus dem englischen = Baukasten, Bausatz) zum Nachweis lebender, geschädigter oder toter Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Produkten, enthaltend
 - i) mindestens ein Reagenz enthaltend einen Induktor und ein Fluoreszenzreagenz das bei lebenden Zellen zur Bildung eines bestimmten Enzyms führt, welches durch Reaktion mit einem spezifischen Fluoreszenzreagenz einen Fluoreszenzfarbstoff freisetzt, der detektierbar wird,
 - ii) mindestens eine Nucleinsäuresonde zum Nachweis von Mikroorganismen über in-situ Hybridisierung wobei die Nucleinsäuresonde an einem Fluoreszenzmarker gebunden ist,

bei dem eine Nachweisgrenze für vermehrungsfähige Mikroorganismen von < 10 CFU/g erreicht wird.

Bei den herkömmlichen Testmethoden werden in der Regel nur 0,1 g und max. 1 g der Probe entnommen und die Tests durchgeführt. Hier ergibt sich ein extremes statistisches Problem und idealerweise sollte ein möglichst großes Probenvolumen untersucht werden. Die herkömmlichen Testmethoden lassen jedoch nur eine Probenmenge in der genannten Größenordnung zu.

Die Kultivierung in „Übernachtskulturen“ entspricht den Standardmethoden, welche in dem internationalem Arzneimittelgesetz vorgeschrieben sind. Eine Übernachtskultur bedeutet dabei speziell, dass die Proben zwischen 8 und 24 Stunden, bevorzugt zwischen 10 und 20 Stunden und insbesondere zwischen 12 und 15 Stunden kultiviert werden. Die Standardbedingungen der Kultivierung sind dem Gesetzestext zu entnehmen. Geringfügige Abweichungen beispielsweise in den Konzentrationen der Nährmedienbestandteile, der Temperatur oder sonstiger Parameter der Standardmethoden für die Kultivierung sollen jedoch vom erfindungsgemä-

ßen Qualitätssicherungssystem eingeschlossen sein. Ebenso sind eventuelle Änderungen im Gesetzestext für das erfindungsgemäße System anwendbar. Die Bedingungen müssen jedoch jeweils dokumentiert werden damit eine Nachweisgrenze für vermehrungsfähige Mikroorganismen bestimmbar wird. So ist es von großer Bedeutung, welche Probenmenge eingesetzt wird.

Erfindungsgemäß werden 5 bis 10 g, bevorzugt 5 g der zu untersuchenden Probe bzw. des zu untersuchenden Produktes in 100 bis 1000 ml Standardlösung suspendiert und in der Übernachtskultur angereichert. Diese Behandlung ist oftmals notwendig, da die Proben teilweise selbst hemmende Wirkung auf Mikroorganismen besitzen können. Um dennoch eine sehr geringe Keimpopulation nachweisen zu können, die die gewünschte Qualität des Produktes bei längerer Lagerung in Bezug auf Hygieneanforderungen zerstören könnte, bedarf es einer Methode, die nach Verdünnung der Probe diese Keime noch nachweisen kann. Hierbei ergibt sich jedoch das Problem der Nachweisgrenze, denn nach Verdünnung ist die Gesamtzahl der Mikroorganismen für die sofortige Anwendung der Testmethoden DEFT oder FISH zu gering, um eine Abwesenheitsprüfung durchführen zu können. Die erste Anforderung an das Qualitätssicherungssystem, eine Abwesenheitsprüfung für vermehrungsfähige Mikroorganismen oder anders gesagt eine Ja/Nein-Bestimmung für vermehrungsfähige Mikroorganismen bereitzustellen, wird dadurch gegeben, dass durch die Übernachtskultur eine Nachweisgrenze von < 10 CFU/g erreicht wird. Insbesondere wird durch die angewendete Probenvorbereitung aus 5 bis 10 g Probe in 100 bis 1000 ml Standardlösung eine Nachweisgrenze von < 1 CFU/g erreicht, bzw. < 1 CFU/5g erreicht. Die von dem internationalen Arzneimittelgesetz geforderte Mindestnachweisgrenze von < 100 CFU/g wird damit deutlich unterschritten. Damit kann der heutige Hygienestandard, der für viele Produkte vom Verbraucher und von der Industrie gefordert wird, eingehalten werden, weil ein Qualitätssicherungssystem entwickelt wurde, was den schnellen Nachweis von geringsten Populationen vermehrungsfähiger Mikroorganismen möglich macht.

Durch die Kombination von zwei Nachweismethoden in einem Kit wird es dem Anwender möglich, direkt und parallel unterschiedliche Proben, Zwischenprodukte und Endprodukte zu testen. So kann während eines Herstellungsprozesses in jeder Phase jedes Zwischenprodukt unabhängig von der Konsistenz auf das Vorhandensein von Mikroorganismen untersucht werden.

Der **Nachweis** von Mikroorganismen im Sinne der Erfindung bedeutet zum einen eine „Ja – Nein“-Bestimmung zur Beantwortung der Frage, ob sich unerwünschte Mikroorganismen in den zu untersuchenden Proben oder Produkten befinden und zum anderen anschließend je nach untersuchter Probe oder Produkt die genaue Identifizierung des detektierten Mikroorga-

nismus. Welcher Nachweis erbracht wird, ist abhängig von der Konsistenz der Probe oder des Produktes und damit von dem zu verwendenden Reagenz und der zu verwendenden Nucleinsäuresonde.

Unter den Begriffen **Proben und Produkte** werden erfindungsgemäß sowohl Zwischenprodukte als auch Endprodukte verstanden. Unter dem Begriff „Proben“ kann des weiteren auch ein Anteil oder Teil eines Zwischenproduktes oder Endproduktes verstanden werden, beispielsweise der flüssige oder feste Anteil eines heterogenen Produktes oder Zwischenproduktes bevorzugt nach jeweils definierten Reaktionszeiten insbesondere zur Kontrolle eines gesamten Herstellungsprozesses. Erfindungsgemäß werden unter „Proben“ ebenfalls beispielsweise Rückstände von Reinigungsprozessen an Produktionsanlagen verstanden. Unter Endprodukte wird erfindungsgemäß sowohl das Endprodukt für den Verbraucher als auch das Rohprodukt verstanden, welches zum Verkauf steht und für die Herstellung von Endprodukten für den Verbraucher verwendet wird.

Im Sinne der Erfindung bedeutet „filtrierbare“ Probe oder Produkt, dass diese durch Filter mit 0,45 µm Porendurchmesser durchgängig sind. Sie sollten also keine Öltröpfchen oder Feststoffpartikel oder ähnliches enthalten.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird aus dem erfindungsgemäßen Kit das Reagenz aus b i) für filtrierbare flüssige Proben und Produkte oder für filtrierbare flüssige Anteile der zu untersuchenden Proben und Produkte zum Nachweis von lebenden Mikroorganismen eingesetzt. Indirekt können so auch tote Mikroorganismen nachgewiesen werden.

Bei dieser Nachweismethode wird der Stoffwechselweg von der Induktion zur Bildung eines Enzyms durch die Aufnahme einer spezifischen Substanz untersucht. Die Induktion geschieht durch ein Reagenz enthaltend einen Induktor und ein Fluoreszenzreagenz, welches die Zellmembran passieren kann woraufhin intrazellulär die induzierten Enzyme die hochfluoreszierende Verbindung entstehen lassen. Zellen ohne intakter Zellmembran oder aktiven Stoffwechsel können das fluoreszierende Reaktionsprodukt nicht bilden und zeigen keine Fluoreszenz. Durch die Verwendung eines weiteren farbigen Reagenzes, welches sich in den toten Zellen anreichert da eine Reaktion durch das induzierte Enzym nicht stattfinden kann, ist eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen möglich.

Erst wenn der Nachweis des Enzyms durch die Bildung des fluoreszierenden Reaktionsproduktes gelingt, ist sichergestellt, dass dieser Stoffwechselweg funktioniert und damit kann diesen Zellen ein funktionsfähiger Stoffwechsel und eine Vermehrungsfähigkeit zugeschrieben werden. Ein Ergebnis liegt bereits nach ca. einer Stunde vor. Zur Trennung der Zellen von

den filtrierbaren Proben oder Produkten werden bevorzugt Membranfilter, insbesondere Polycarbonatfilter einer Porengröße von 0,2 bis 1,20 µm, bevorzugt 0,45 µm genutzt. Wenn es möglich ist, können die zu untersuchenden Proben und Produkte auch in geeigneter Weise verflüssigt werden. Zu dieser Probe wird ein Induktor des gesuchten Enzyms zugesetzt und anschließend ein Fluoreszenzreagenz, welches erst nach Reaktion mit dem gesuchten und induzierten Enzym seine Fluoreszenz entwickelt.

Zu diesen spezifischen Fluoreszenzreagenzien zählt beispielsweise Fluoresceindigalactosid zum Nachweis von Galactosidase welches durch Galactose als Induktor induziert wurde. Mit diesen Induktor und Fluoreszenzreagenz können Lactobazillen und coliforme Bakterien wie *Escherichia coli*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonaden* und weitere Prozesswasser-relevante Keime nachgewiesen werden.

Zu den **Fluoreszenzreagenzien** zählen erfindungsgemäß 4-Methylumbelliferon-Derivate, die speziell für bestimmte Enzyme derivatisiert werden. Beispielsweise findet 4-Methylumbelliferonheptanoat für den Nachweis von Lipase oder Esterase Anwendung. Für den Nachweis von Galactosidase kann auch 4-Methylumbelliferon-β-D-galactosid angewendet werden. Die Lösung wird dann durch die beschriebenen Mikrofilter filtriert und fluoreszenzoptisch mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops untersucht.

In einer weiteren Anwendungsform werden die Indikatoren und Fluoreszenzreagenzien zu den Rückständen auf dem Filter gegeben.

In einer weiteren Ausführungsform wird aus dem Kit die **Nucleinsäuresonde aus b ii)** sowohl für filtrierbare flüssige Proben und Produkte als auch für nichtfiltrierbare Proben und Produkte als auch für Gemische aus filtrierbaren und nichtfiltrierbaren Proben und Produkten zum Nachweis von lebenden Mikroorganismen eingesetzt.

Bei der Nukleinsäuresonde im Sinne der Erfindung kann es sich um eine DNA- oder RNA-Sonde handeln, die in der Regel zwischen 12 und 1000 Nukleotide, bevorzugt zwischen 12 und 500, bevorzugter zwischen 12 und 200, besonders bevorzugt zwischen 12 und 50 und zwischen 15 und 40, und am meisten bevorzugt zwischen 17 und 25 Nukleotide umfassen wird. Die Auswahl der Nukleinsäuresonden geschieht nach den Gesichtspunkten, ob eine komplementäre Sequenz in dem nachzuweisenden Mikroorganismus vorliegt. Durch diese Auswahl einer definierten Sequenz, kann dadurch eine Bakterienart, eine Bakteriengattung oder eine ganze Bakteriengruppe erfasst werden. Komplementarität sollte bei einer Sonde von 15 Nukleotiden über 100% der Sequenz gegeben sein. Bei Oligonukleotiden mit mehr als 15 Nukleotiden sind ein bis mehrere Fehlpaarungsstellen erlaubt.

Die Nucleinsäuresonden aus dem erfindungsgemäßen Kit sind in der Lage, durch unspezifische Nucleinsäuresonden unspezifisch Mikroorganismen nachzuweisen. Damit kann die oft gestellte Frage geklärt werden, ob sich unerwünschte Mikroorganismen in Proben oder Produkten befinden, ohne den Mikroorganismus genau zu charakterisieren.

Die Hybridisierungsbedingungen und die Dauer der Hybridisierung werden je nach Produkt und zu untersuchender Probe in Abhängigkeit von der Nucleinsäuresonde angepasst.

Als detektierbare Marker für die Nucleinsäuresonden werden z. B. fluoreszierende Gruppen wie z. B. CY2 (erhältlich von Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, USA), CY3 (ebenfalls erhältlich von Amersham Life Sciences), CY5 (ebenfalls zu beziehen von Amersham Life Sciences), FITC (Molecular Probes Inc., Eugene, USA), FLUOS (erhältlich von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), TRITC (erhältlich von Molecular Probes Inc. Eugene, USA), 6-FAM oder FLUOS-PRIME verwendet.

Das erfindungsgemäße Qualitätssicherungssystem kann zum Nachweis von gram pos. und /oder gram neg. Bakterien und/oder Hefen und/oder Schimmelpilzen und/oder Algen verwendet werden.

Zu den gram-pos. Bakterien zählen neben den umweltrelevanten auch medizinisch relevante Keime wie beispielsweise Staphylokokken, Streptokokken, Milzbrand-, Starrkrampf-, Milchsäure-, Diphtherie-, Schweinerotlauf- oder Heubakterien. Zu den gram-neg. Bakterien zählen ebenfalls neben den umweltrelevanten auch medizinisch relevante Keime wie Gonokokken, Meningokokken, Legionellen, Coli-, Typhus-, Rur- und Pestbakterien. Zu den umweltrelevanten und Mensch-assoziierten Keimen gehören unter anderem prozesswasserspezifische Keime wie Pseudomonaden, Burkholderien, Raoultellen, Klebsiellen, Corynebakterien und Bazillus-Arten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Qualitätssicherungssystems zum Nachweis von Mikroorganismen und zur Qualitätsüberprüfung von filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Proben oder Produkten sowie zur Beurteilung des Hygienezustandes von Produktionsanlagen. Die zu untersuchenden filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Proben oder Produkte sind ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird aus Rohprodukten, Kosmetikprodukten, pharmazeutischen Zubereitungen, Nahrungsmitteln, Nahrungsergänzungsmitteln, Textilhilfsmitteln, Wasch- und Reinigungsmitteln sowie Farben und Lacke.

Unter **Rohprodukte** werden im Sinne der Erfindung Produkte verstanden, die zur Herstellung von Endprodukte für den Verbraucher verwendet werden. Hierbei kann es sich um Tenside, Ölkörper, Emulgatoren, Perlglanzwachse, Konsistenzgeber, Verdickungsmittel, Überfettungsmittel, Stabilisatoren, Polymere, Siliconverbindungen, Fette, Wachse, Lecithine, Phospholipide, UV-Lichtschutzfaktoren, Antioxidantien, Deodorantien, Antitranspirantien, Antischuppenmittel, Filmbildner, Quellmittel, Insektenrepellentien, Selbstbräuner, Tyrosinaseinhibitoren (Depigmentierungsmittel), Hydrotrope, Solubilisatoren, Konservierungsmittel, Parfümöle, nichtfiltrierbare O/W- und W/O-Emulsionen handeln. Prozesswasser ist ebenfalls als Rohstoff zu sehen.

Bei den **Kosmetikprodukten** kann es sich beispielsweise um Salben, Cremes, Lotionen, Shampoo, Conditioner, Duschgels, Badezusätze, dekorative Kosmetik wie Make up, Lidschatten, Lippenstift, Nagellack oder ähnliches handeln. Die **pharmazeutischen** Zubereitungen können in Form von Säften, Cremes, Salben, Lotionen, Suspensionen, Tinkturen, Tropfen oder ähnliches vorliegen.

Die **Nahrungsmittel** sind bevorzugt Milch oder Milchprodukte, Back- oder Fleischwaren, Getränke wie Mineralwasser, Bier, Limonade oder Fruchtsaft. Als **Nahrungsergänzungsmittel** werden bevorzugt Vitaminlösungen, ungesättigte Fettsäuren insbesondere konjugierte Linolsäuren, Konservierungsmittel oder Antioxidantien genannt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Produkten bei dem das erfindungsgemäße Qualitätssicherungssystem angewendet wird, indem man die Proben

- a) zur Anreicherung von Mikroorganismen in einer "Übernachtskultur" entsprechend 8 bis 24 Stunden kultiviert unter Standardbedingungen gemäß internationalen Arzneimittelgesetzbüchern, Lebensmittelgesetzgebungen und Kosmetikverordnungen und
- b) ein Kit zum Nachweis lebender, geschädigter oder toter Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Proben oder Produkten anwendet, indem man die angereicherte Probe
 - i) mit einem Reagenz enthaltend einen Induktor und ein Fluoreszenzreagenz inkubiert, welches in den Zellen die Bildung eines speziellen Enzyms induziert und dabei aus einem Fluoreszenzreagenz eine fluoreszierende Verbindung entstehen lässt, und/oder

- ii) nach Fixieren der Bakterien diese mit einer Nucleinsäuresonde inkubiert, welche mit einem Fluoreszenzmarker versehen ist um eine Hybridisierung herbeizuführen und
- c) die Fluoreszenz der Proben detektiert und mit der Anzahl der Zellen korreliert wobei die Anzahl der Zellen bestimmbar wird und beim Einsatz von b) i) zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden kann.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung wird unter "Fixieren" der Bakterien eine Behandlung verstanden, mit der die Bakterienhülle für Nukleinsäuresonden durchlässig gemacht wird. Zur Fixierung wird üblicherweise Ethanol verwendet. Es kann jedoch auch Methanol, Mischungen von Alkoholen, eine niederprozentige Paraformaldehydlösung oder eine verdünnte Formaldehydlösung, enzymatische Behandlungen oder ähnliches verwendet werden.

Für die "Hybridisierung" werden im Sinne der Erfindung die fixierten Bakterien mit fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuresonden inkubiert. Diese Nukleinsäuresonden, die aus einem Oligonukleotid und einem daran gebundenen Marker bestehen, können dann die Zellhülle penetrieren und sich an die der Nukleinsäuresonde entsprechenden Zielsequenz im Zellinneren binden. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresonden können mit verschiedenen Hybridisierungslösungen eingesetzt werden. Verschiedene organische Lösungsmittel können hierbei in Konzentrationen von 0–80% eingesetzt werden. Durch das Einhalten von stringenten Hybridisierungsbedingungen wird gewährleistet, dass die Nukleinsäuresonde auch tatsächlich mit der Zielsequenz hybridisiert. Moderate Bedingungen im Sinne der Erfindung sind z. B. 0% Formamid in einem Hybridisierungspuffer wie er nachfolgend beschrieben ist. Stringente Bedingungen im Sinne der Erfindung sind beispielsweise 20–80% Formamid im Hybridisierungspuffer.

Eine typische Hybridisierungslösung enthält 0%–80% Formamid, bevorzugt 20%–60% Formamid, besonders bevorzugt 35% Formamid. Sie hat außerdem eine Salzkonzentration von 0,1 mol/l–1,5 mol/l, bevorzugt von 0,5 mol/l–1,0 mol/l, bevorzugter von 0,7 mol/l–0,9 mol/l, besonders bevorzugt von 0,9 mol/l, wobei es sich bei dem Salz vorzugsweise um Natriumchlorid handelt. Weiter umfasst die Hybridisierungslösung üblicherweise ein Detergens, wie z. B. Natriumdodecylsulfat (SDS), in einer Konzentration von 0,001%–0,2%, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,005–0,05%, bevorzugter von 0,01–0,03%, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 0,01%. Zum Puffern der Hybridisierungslösung können verschiedene Verbindungen wie Tris-HCl, Natrium-Citrat, PIPES oder HEPES verwendet werden, die üblicherweise Konzentrationen von 0,01–0,1 mol/l eingesetzt werden, bevorzugt von 0,01 bis 0,08 mol/l, in einem pH- Wert-Bereich von 6,0–9,0, bevorzugt 7,0 bis 8,0. Die besonders be-

vorzugte erfindungsgemäße Ausführung der Hybridisierungslösung beinhaltet 0,02 mol/l Tris-HCl, pH 8,0.

Die Konzentration der Sonde kann je nach Markierung und Anzahl der zu erwartenden Zielstruktur stark schwanken. Um eine schnelle und effiziente Hybridisierung zu ermöglichen, sollte die Sondenmenge die Anzahl der Zielstrukturen um mehrere Größenordnungen überschreiten. Allerdings ist bei der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) darauf zu achten, dass eine zu hohe Menge an fluoreszenzmarkierter Hybridisierungssonde zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz führt. Die Menge an Sonde sollte deshalb in einem Bereich zwischen 0,5 ng/l und 500 ng/l, bevorzugt zwischen 1,0 ng/l und 100 ng/l und besonders bevorzugt bei 1, 0–50 ng/l liegen.

Die Dauer der Hybridisierung beträgt üblicherweise zwischen 10 Minuten und 12 Stunden; bevorzugt erfolgt die Hybridisierung für etwa 1,5 Stunden. Die Hybridisierungstemperatur beträgt bevorzugt zwischen 44°C und 48°C, besonders bevorzugt 46°C, wobei der Parameter der Hybridisierungstemperatur, wie auch die Konzentration an Salzen und Detergenzien in der Hybridisierungslösung in Abhängigkeit von den Nukleinsäuresonden, insbesondere deren Längen und dem Grad der Komplementarität zur Zielsequenz in der nachzuweisenden Zelle optimiert werden kann. Nach erfolgter Hybridisierung werden die nicht hybridisierten und überschüssigen Nukleinsäuresondenmoleküle mittels einer herkömmlichen Waschlösung entfernt bzw. abgewaschen. Diese Waschlösung kann, falls gewünscht, 0,001–0,1% eines Detergens wie SDS, wobei eine Konzentration von 0,01% bevorzugt wird, sowie Tris-HCl in einer Konzentration von 0,001–0,1 mol/l, bevorzugt 0,01–0,05 mol/l, besonders bevorzugt 0,02 mol/l, enthalten. Weiter enthält die Waschlösung üblicherweise NaCl, wobei die Konzentration je nach benötigter Stringenz von 0,003 mol/l bis 0,9 mol/l, bevorzugt von 0,01 mol/l bis 0,9 mol/l, beträgt. Des Weiteren kann die Waschlösung EDTA in einer Konzentration bis zu 0,01 mol/l enthalten, wobei die Konzentration vorzugsweise 0,005 mol/l beträgt. Des weiteren werden zur Waschlösung noch Pufferlösungen eingesetzt, die den Hybridisierungspuffer in einer geringeren Salzkonzentration entsprechen.

Das "Abwaschen" der nicht gebundenen Nukleinsäuresondenmoleküle erfolgt üblicherweise bei einer Temperatur im Bereich von 30°C bis 50°C, bevorzugt von 44°C bis 50°C und besonders bevorzugt bei 46°C für eine Dauer von 10–40 Minuten, vorzugsweise für 15 Minuten. Das Ergebnis bei Verwendung des erfindungsgemäßen Kits liegt nach 24 bis 48 Stunden vor. Die jeweiligen mit Fluoreszenzreagenz oder Fluoreszenzmarker behandelte Proben oder Produkte werden anschließend mit Hilfe eines Mikroskops, bevorzugt eines Epifluoreszenzmikroskops optisch detektiert.

Patentansprüche

- 1) Qualitätssicherungssystem zum Nachweis von vermehrungsfähigen Mikroorganismen enthaltend,
 - a) ein System zur Anreicherung von Mikroorganismen in einer Probe in einer "Übernachtskultur" entsprechend 8 bis 24 Stunden Kultivierung unter Standardbedingungen gemäß internationalen Arzneimittelgesetzbüchern, Lebensmittelgesetzgebungen und Kosmetikverordnungen
 - b) ein Kit zum Nachweis lebender, geschädigter oder toter Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Proben oder Produkten, enthaltend
 - i) mindestens ein Reagenz enthaltend einen Induktor und ein Fluoreszenzreagenz das bei lebenden Zellen zur Bildung eines bestimmten Enzyms führt, welches durch Reaktion mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoffreagenz einen Fluoreszenzfarbstoff freisetzt, der detektierbar wird
 - ii) mindestens eine Nucleinsäuresonde zum Nachweis von Mikroorganismen über in-situ Hybridisierung wobei die Nucleinsäuresonde an einem Fluoreszenzmarker gebunden ist

bei dem eine Nachweisgrenze für vermehrungsfähige Mikroorganismen von < 10 CFU/g erreicht wird.
- 2) Qualitätssicherungssystem gemäß Anspruch 1, bei dem eine Nachweisgrenze für vermehrungsfähige Mikroorganismen von < 1 CFU/g erreicht wird.
- 3) Kit gemäß Anspruch 1, wobei das Reagenz aus b i) für filtrierbare flüssige Proben und Produkte oder für filtrierbare flüssige Anteile der zu untersuchenden Proben und Produkte zum Nachweis von lebenden und indirekt zum Nachweis von toten Mikroorganismen eingesetzt werden kann.

- 4) Kit gemäß Anspruch 1, wobei die Nucleinsäuresonde aus b ii) sowohl für filtrierbare flüssige Proben und Produkte als auch für nichtfiltrierbare Proben und Produkte als auch für Gemische aus filtrierbaren und nichtfiltrierbaren Proben und Produkten zum Nachweis von lebenden Mikroorganismen eingesetzt werden kann.
- 5) Qualitätssicherungssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zum Nachweis von gram pos. und /oder gram neg. Bakterien und/oder Hefen und/oder Schimmelpilzen und/oder Algen.
- 6) Verwendung von Qualitätssicherungssystemen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zum Nachweis von Mikroorganismen und zur Qualitätsüberprüfung von filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Produkten sowie zur Beurteilung des Hygienezustandes von Produktionsanlagen, wobei eine Nachweisgrenze von < 10 CFU/g erreicht wird.
- 7) Verwendung von Qualitätssicherungssystemen nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zum Nachweis von Mikroorganismen zur Qualitätsüberprüfung von filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Produkten ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet wird aus Rohprodukten, Kosmetikprodukten, pharmazeutischen Zubereitungen, Nahrungsmitteln, Nahrungsergänzungsmitteln, Getränken, Textilhilfsmitteln, Wasch- und Reinigungsmitteln sowie Farben und Lacke.
- 8) Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Produkten bei dem ein Qualitätssicherungssystem gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 angewendet wird, indem man die Proben
 - a) zur Anreicherung von Mikroorganismen in einer "Übernachtskultur" entsprechend 8 bis 24 Stunden kultiviert unter Standardbedingungen gemäß internationalen Arzneimittelgesetzbüchern, Lebensmittelgesetzgebungen und Kosmetikverordnungen und
 - b) ein Kit zum Nachweis lebender, geschädigter oder toter Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Proben oder Produkten anwendet, indem man die angereicherte Probe

- i) mit einem Reagenz enthaltend einen Induktor und ein Fluoreszenzreagenz inkubiert, welches in den Zellen die Bildung eines speziellen Enzyms induziert und dabei aus einem Fluoreszenzreagenz eine fluoreszierende Verbindung entstehen lässt, und/oder
- ii) nach Fixieren der Bakterien diese mit einer Nucleinsäuresonde inkubiert, welche mit einem Fluoreszenzmarker versehen ist um eine Hybridisierung herbeizuführen und
- c) die Fluoreszenz der Proben detektiert und mit der Anzahl der Zellen korreliert wobei die Anzahl der Zellen bestimmbar wird und beim Einsatz von b) i) zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden kann.

Zusammenfassung

Vorgeschlagen wird ein Qualitätssicherungssystem zum Nachweis von vermehrungsfähigen Mikroorganismen enthaltend,

- a) ein System zur Anreicherung von Mikroorganismen in einer Probe in einer "Übernachtskultur" entsprechend 8 bis 24 Stunden Kultivierung unter Standardbedingungen gemäß internationalen Arzneimittelgesetzbüchern, Lebensmittelgesetzgebungen und Kosmetikverordnungen
- b) ein Kit zum Nachweis lebender, geschädigter oder toter Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Proben oder Produkten, enthaltend
 - i) mindestens ein Reagenz enthaltend einen Induktor und ein Fluoreszenzreagenz das bei lebenden Zellen zur Bildung eines bestimmten Enzyms führt, welches durch Reaktion mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoffreagenz einen Fluoreszenzfarbstoff freisetzt, der detektierbar wird
 - ii) mindestens eine Nucleinsäuresonde zum Nachweis von Mikroorganismen über in-situ Hybridisierung wobei die Nucleinsäuresonde an einem Fluoreszenzmarker gebunden ist

bei dem eine Nachweisgrenze für vermehrungsfähige Mikroorganismen von < 10 CFU/g erreicht wird.

Des weiteren wird die Verwendung des erfindungsgemäßen Qualitätssicherungssystems und ein Verfahren zum Nachweis lebender, geschädigter oder toter Mikroorganismen in filtrierbaren und/oder nichtfiltrierbaren Proben oder Produkten unter Anwendung des erfindungsgemäßen Qualitätssicherungssystems vorgeschlagen.